

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年4月15日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/031769 A1(51) 国際特許分類: G01N 33/53, 37/00, 13/16, 33/566,
C12N 15/00, C12Q 1/68, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012168

(22) 国際出願日: 2003年9月24日 (24.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-292861 2002年10月4日 (04.10.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ソニー株
式会社 (SONY CORPORATION) [JP/JP]; 〒141-0001
東京都品川区北品川6丁目7番35号 Tokyo (JP).川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内
Tokyo (JP). 木下隆 (KINOSHITA, Takashi) [JP/JP]; 〒
141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソ
ニー株式会社内 Tokyo (JP).(74) 代理人: 小池晃, 外(KOIKE, Akira et al.); 〒100-0011
東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 大和生命ビ
ル11階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, SG, US.

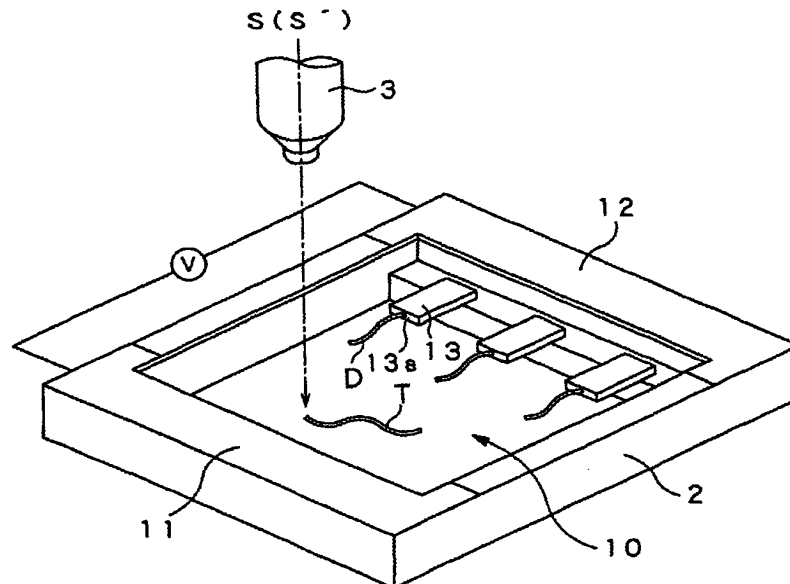
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 真峯 隆義
(MAMINE, Takayoshi) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INTERACTION DETECTING METHOD AND BIOASSAY DEVICE, AND BIOASSAY-USE SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置、並びにバイオアッセイ用基板



(57) Abstract: In a cell detection unit (2), the end face (13a) of a cantilever (13) is surface-treated in advance to enable a detecting nucleotide chain (D) to be immobilized. In a reaction area (10), an electric field is produced by an anode (11) and a cathode (12) to move a target nucleotide chain (T) dripped from a nozzle (3) toward an end face (13a) while kept stretched. Since hybridizing between the detecting nucleotide chain (D) and the target nucleotide chain (T) increases the mass of a cantilever (13), a natural frequency decreases. When an ac voltage is applied to a cantilever (13) to measure a change in natural frequency, the presence or absence of hybridization is detected and the number or the like of the hybridized target nucleotide chains (T) is quantitatively detected.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/031769 A1



(57) 要約: セル検出部(2)において、カンチレバー(13)の端面(13a)は予め表面処理が施されており、検出用ヌクレオチド鎖Dを固定化可能とされている。反応領域(10)には正電極(11)及び負電極(12)によって電界が生じており、ノズル(3)から滴下された標的ヌクレオチド鎖Tは、伸長したまま端面(13a)の方向に移動する。検出用ヌクレオチド鎖Dと標的ヌクレオチド鎖Tとがハイブリダイゼーションするとカンチレバー(13)の質量が増加するため、固有振動数が低下する。そこで、カンチレバー(13)に交流電圧を印加して固有振動数変化を測定することで、ハイブリダイゼーションの有無を検出すると共に、ハイブリダイゼーションした標的ヌクレオチド鎖Tの本数等を定量的に検出する。

明細書

相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置、並びにバイオアッセイ用基板

技術分野

本発明は、バイオインフォマティクス（生命情報科学）分野において特に有用な相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置、並びにバイオアッセイ用基板に関する。

本出願は、日本国において2002年10月4日に出願された日本特許出願番号2002-292861を基礎として優先権を主張するものであり、この出願は参照することにより、本出願に援用される。

背景技術

現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、DNAチップと総称する。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の突然変異、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範に活用され始めている。

このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種多数のDNAオリゴヌクレオチド鎖や、cDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織等から抽出したmRNA（messenger RNA）を逆転写PCR（Polymerase Chain Reaction）反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらPCR増幅し、上記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うというもの

である。

ここで、DNAチップは、2つのタイプに分類できる。第1のタイプは、半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス (Affymetrix) 社によるものが代表的である。この第1のタイプのDNAチップについては、例えば日本公表特許公報平4-505763号に記載されている。

一方、第2のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意されたDNAを基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである。この第2のタイプのDNAチップは、集積度は第1のタイプのDNAチップに比べて低いものの、1 kb程度のDNA断片を固相化できるという利点がある。この第2のタイプのDNAチップについては、例えば日本公表特許公報平10-503841号に記載されている。

また、国際公開第01/33226号パンフレットには、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems: マイクロマシン) を用いて作製されたカンチレバー (片持ち梁) を利用する、上述した従来のDNAチップ技術とは異なる技術的思想に基づくカンチレバーセンサー技術が提案されている。

この国際公開第01/33226号パンフレットに記載されたカンチレバーセンサーによる解析手法の一例を簡潔に説明すると、上面にDNAプローブが固相化されたカンチレバーにレーザー光を照射し、ハイブリダイゼーション反応の結果カンチレバーが撓むことにより所定位置の受光部における反射光の強度が変化するのを測定することで、ハイブリダイゼーション反応の有無を検出するというものである。

しかしながら、上述した従来のDNAチップ技術では、2次元である基板の狭小な検出部において、DNAプローブ等の検出用ヌクレオチド鎖やタンパク質等を固相化 (固定化) し、ハイブリダイゼーション反応や抗原抗体反応等の物質間の相互反応を進行させるという技術であることから、空間的に反応生成物の自由度が制限され、また、反応の際に立体障害が発生する可能性があった。このため、従来のDNAチップ技術等では、相互反応の効率が悪く、反応時間が長いという問題があった。

また、従来のDNAチップ技術では、試料溶液は、基板上の所定のスポット部位（検出部）に滴下されるのみであって、試料溶液に含まれている標的物質とスポット部位に固定された状態の検出物質との相対的な位置決めを行うための工夫は、何ら講じられていなかった。

一方、上述したカンチレバーセンサー技術では、試料溶液に含まれている標的物質を予め蛍光標識する必要がないという利点がある一方で、カンチレバーを高集積化した場合に、カンチレバー表面にレーザー光を照射し、その反射光を受光する機械的な制御が困難になるという問題があった。

発明の開示

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、標的物質に対する蛍光標識等を行うことなく、ハイブリダイゼーションその他の物質間の相互作用を定量性よく検出する相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置、並びにバイオアッセイ用基板を提供することを目的とする。

上述した目的を達成するために、本発明に係る相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置は、検出用物質を固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーと、当該表面処理部に固定化された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、上記カンチレバーを振動励起する駆動源と、上記カンチレバーの振動振幅を検出する振動検出手段とを少なくとも備える検出部において物質間の相互反応作用を検出するものであり、上記相互反応作用に基づく上記カンチレバーの固有振動数の変化を測定することで、上記相互反応作用を検出する。

ここで、上記カンチレバーは、対向電極間に圧電材料を配置してなる振動子を有しており、上記駆動源は、上記対向電極間に交流電圧を印加することにより上記カンチレバーを振動励起する。

また、上記検出用物質及び上記標的物質は、例えばヌクレオチド鎖であり、上記相互反応作用は、例えばハイブリダイゼーションである。

このような相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置では、検出用物質を

固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーに検出用物質を固定化し、上記検出用物質と標的物質との相互反応作用に基づく上記カンチレバーの固有振動数変化を測定することで、上記相互反応作用を検出する。

例えば、上記検出用物質及び上記標的物質がヌクレオチド鎖である場合、上記カンチレバーの端面に固定化された検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖とがハイブリダイゼーションすると上記カンチレバーの質量が増加するため、カンチレバーの固有振動数が低下する。そこで、本発明に係る相互反応作用検出方法及びバイオアッセイ装置では、この固有振動数変化を測定することで、ハイブリダイゼーションを検出する。

また、上述した目的を達成するために、本発明に係るバイオアッセイ用基板は、検出用物質を固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーと、当該表面処理部に固定化された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域とを少なくとも備える検出部が設けられたものである。

ここで、上記検出部は、上記カンチレバーが一壁面から突出して設けられたセル検出部として構成することができ、このセル検出部は、基板上に複数配設される。本発明に係るバイオアッセイ用基板は、円盤状基板として形成することができ、この場合、セル検出部は、上方視放射状を呈するように配設される。

また、バイオアッセイ用基板を円盤状基板として形成する場合において、上記反応領域を基板上に放射状に延設された条溝内に設けるようにしてもよく、この場合、上記カンチレバーは、上記条溝の片側から突出して設けられる。

さらに、上記セル検出部若しくは条溝単位、又はグルーピングされた複数のセル検出部若しくは条溝単位に、異なる検出用物質を固定化することができる。

さらにまた、上記反応領域に対して、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こり得る物質を充填してもよい。

このようなバイオアッセイ用基板では、上記相互反応作用に基づく上記カンチレバーの固有振動数の変化を測定することで上記相互反応作用が検出される。

本発明の更に他の目的、本発明によって得られる具体的な利点は、以下に説明される実施例の説明から一層明らかにされるであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、本実施の形態におけるバイオアッセイ装置に用いられるバイオアッセイ用基板の外観を示す斜視図である。

図 2 は、同バイオアッセイ用基板に多数配設されたセル検出部の 1 つを拡大して示す斜視図である。

図 3 は、同セル検出部の反応領域側に突設されたカンチレバーを拡大して示す斜視図である。

図 4 A 乃至図 4 D は、同カンチレバーの作製工程の一例を説明する図である。

図 5 は、同カンチレバーの固有振動数変化を検出する方法を示す図である。

図 6 は、交流電源の周波数を変化させた際に計測される電圧波形を示す図である。

図 7 は、同カンチレバーの他の構成を示す斜視図である。

図 8 は、圧電素子を含む位置におけるカンチレバーの垂直断面を示す図である。

図 9 A 及び図 9 B は、同バイオアッセイ装置に用いられる基板の他の例を説明する図であり、図 9 A は、基板の上方視平面図を示し、図 9 B は、図 9 A 中の X 部の拡大平面図を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を適用した具体的な実施の形態について、図面を参照しながら詳細に説明する。この実施の形態で説明するバイオアッセイ装置及びその相互反応作用検出方法は、対向電極間に圧電材料を配置してなる振動子を有するカンチレバー（片持ち梁）の端面に予め検出用ヌクレオチド鎖（検出用物質）の末端部位を固定化し、この検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖（標的物質）とのハイブリダイゼーション反応に由来する質量変化によりカンチレバーの固有振動数が増加することを利用して、ハイブリダイゼーション反応を定量的に検出するものである。

ここで、本明細書において「ヌクレオチド鎖」とは、プリン塩基又はピリミジン塩基と糖とがグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNAプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドとが重合したDNA（全長或いはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA等を広く含む。

先ず、本実施の形態におけるバイオアッセイ装置に用いられるバイオアッセイ用基板（以下、基板と略称する。）1の外観斜視図を図1に示す。図1に示す基板1は、CD（Compact Disk）、DVD（Digital Versatile Disk）、MD（Mini Disk）（登録商標）等の光情報記録媒体に用いられる円盤状基板（ディスク）に採用される基材から形成されている。

この基材は、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレンその他の円盤状に成型可能な合成樹脂、好ましくは射出成型可能な合成樹脂によって円盤状に形成されている。なお、安価な合成樹脂基板を用いることで、従来のガラス基板に比して低ランニングコストを実現できる。基板1の中心には、基板1を回転する場合に使用されるスピンドル固定用の孔（図示せず）を形成することもできる。

基板1の一方の表面には、基板1の中心の周辺領域から上方視放射状に延びるように、周辺の基板領域とは区画された小室状の反応領域を備えるセル検出部2が多数配設されている。

このセル検出部2は、基板1上の適切な位置に配設することが可能であるが、このように上方視放射状に配設することで、基板1上のスペースを有効に利用することができ、情報の集積密度を高めることができる。

また、セル検出部2は、互いにコンタミネーションしないように区画されているため、セル検出部単位又はグルーピングされたセル検出部単位で、異なる検出用ヌクレオチド鎖を固定化し、検出用ヌクレオチド鎖毎に別個独立の条件を設定して、ハイブリダイゼーション反応を進行させることができる。

例えば、疾病発症のマーカー遺伝子を基板1上にグルーピングして固定化することができ、これにより1つの基板1を用いて同時に複数の疾病の発現状況を確認

認することができる。

また、 T_m (Melting Temperature) 又はGC含有率の違いに基づいて、固定化する検出用ヌクレオチド鎖をグルーピングしておくことも可能である。これにより、アクティブなハイブリダイゼーション反応が得られるバッファー組成、濃度等の反応条件、洗浄条件、滴下するサンプル溶液濃度等を、検出用ヌクレオチド鎖の性質に応じてきめ細かく選択することが可能となり、解析作業において疑陽性又は疑陰性が示される危険性を減少させることができる。

このセル検出部2の1つを拡大した外観斜視図を図2に示す。図2に示すように、セル検出部2は、検出用ヌクレオチド鎖Dと標的ヌクレオチド鎖Tとの間のハイブリダイゼーション反応の場となる反応領域10と、その反応領域10の両端に電場（電界）を形成する正電極11及び負電極12と、セル検出部2の負電極12側から突出して設けられたカンチレバー13とを備えている。

反応領域10は、上方に開口する略正方形のセル、例えば、深さが $1\mu\text{m}$ 、長さ及び幅が共に $100\mu\text{m}$ のセルとして形成されているが、図示された形状、サイズに限定されない。

上述したカンチレバー13の反応領域10側の端面13aは、検出用ヌクレオチド鎖Dの末端部位がカップリング反応等の化学結合によって固定化されるように、表面処理が施されている。すなわち、この端面13aは、DNAプローブ等の検出用ヌクレオチドDの予め加工された末端部位を固定化するのに好適な表面処理が施されていればよい。例えば、ストレプトアビジンによってカンチレバー13の端面13aが表面処理されている場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖末端の固定化に適している。なお、ここでは端面13aに表面処理が施されているが、これに限定されるものではなく、カンチレバー13の少なくとも一部に表面処理が施されていればよい。

ここで、ヌクレオチド鎖内では、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素イオン（陽電荷）とによってイオン雲が形成されていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトルが、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長する。さらに、電気力線が一部に集中する不均一電

界が印加された場合、ヌクレオチド鎖は、電気力線が集中する部位に向かって移動する (Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi Tazawa, Osamu Kurosawa and Masao Washizu: "Quantitative analysis on electrostatic orientation of DNA in stationary AC electric field using fluorescence anisotropy", IEEE Transaction on Industrial Application, Vol. 34, No. 1, p. 75-83 (1998) 参照)。

そこで、正電極 1 1 及び負電極 1 2 により、各カンチレバー 1 3 の端面 1 3 a に電気力線が集中するような高周波高電圧の電界を印加すると、高周波高電圧の印加によって伸長処理されたヌクレオチド鎖が端面 1 3 a に向かって移動し、その末端部位が端面 1 3 a と接触することによって、検出用ヌクレオチド D の末端部位をカンチレバー 1 3 の端面 1 3 a に確実に固定化することができる。特に、カンチレバー 1 3 として、後述するように P Z T (ジルコン酸チタン酸鉛) や S B T (タンタル酸ストロンチウムビスマス) 等の圧電性を有する強誘電体を用いる場合には、その強誘電体により電気力線がカンチレバー 1 3 の端面 1 3 a に集中するため好適である。

図 2 中にその先端部位を示すノズル 3 は、試料溶液 S (S') を滴下するものであり、後述するように基板 1 から提供される位置情報と回転同期情報とに基づいて、検出用ヌクレオチド鎖 D を含有する試料溶液 S と標的ヌクレオチド鎖 T を含有する試料溶液 S' とを、反応領域 1 0 に正確に追従して滴下する構成とされている。

滴下手段としては、インクジェットプリンティング法を好適に採用することができる。これは、所定の反応領域 1 0 に正確に追従して微小滴を滴下することができるためである。

「インクジェットプリンティング法」は、インクジェットプリンターで用いられるノズルを応用する方法であり、電気を用いてインクジェットプリンターのようにプリンターヘッドから基板 1 に試料溶液 S (S') を噴射するものである。この方法には、圧電式インクジェット法、バブルジェット (登録商標) 法、超音波ジェット法がある。

圧電式インクジェット法は、圧電体にパルスを印加することによって生じる変

位の圧力により液滴を飛ばす方式である。また、バブルジェット（登録商標）法は、熱方式であって、ノズル中のヒーターを熱して発生させた気泡の圧力によって液滴を飛ばす方式である。ノズル内にヒーターとなるシリコン基板を埋め込み、約 $300^{\circ}\text{C}/\text{s}$ で制御して一様な気泡を作成し、液滴を押し出す。しかしながら、試料溶液 S (S') が高温に曝されることになるため、生体物質試料を用いる場合には注意を要する。超音波ジェット法は、超音波ビームを試料溶液 S (S') の自由面に当て、局所的に高い圧力を与えることによってその箇所から小滴を放出させる方式である。ノズルを必要とせず、高速で直径約 $1\ \mu\text{m}$ の小滴を形成できる。

本実施の形態においては、「インクジェットプリント法」として、「圧電式インクジェット法」を好適に採用できる。印加するパルスの形状を変えることによって、液滴（微小滴）のサイズを制御することができるため、解析精度向上に好適である。すなわち、液滴表面の曲率半径が小さいときには液滴を小さくし、液滴の曲率半径が大きいときには液滴を大きくすることができる。また、パルスを急激に負の方向に変化させることにより液滴表面を内側に引っ張り、曲率半径を小さくすることも可能である。

ここで、反応領域 10 に滴下されてきた検出用ヌクレオチド D の多くは、塩基が重層した状態でカンチレバー 13 の端面 13a に固定化されるため、後から滴下された標的ヌクレオチド鎖 T とのハイブリダイゼーション反応の際には、立体障害の問題が発生してしまう。

そこで本実施の形態では、セル検出部 2 に配設された正電極 11 と負電極 12 との間に電位差を生じさせることで反応領域 10 に貯留保持されている液層（塩溶液）に電場（電界）を形成し、電界の向きに沿って検出用ヌクレオチド D を直鎖状に伸長させる。なお、上記高周波高電圧は、 $1 \times 10^6 \text{V}/\text{m}$ 、約 1MHz 付近が好適と考えられる（Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application, Vol. 26, No. 26, p. 1165-1172 (1990) 参照）。

なお、基板 1 上にセル検出部 2 が列設された場合においては、セル検出部 2 毎に正電極 11 及び負電極 12 を設けるようにしてもよく、また、正電極 11 及び負電極 12 をそれぞれ共通電極化するようにしてもよい。

上述のように高周波高電圧を印加することにより、検出用ヌクレオチド鎖D及び標的ヌクレオチド鎖Tが直鎖状に伸長するため、立体障害が少なくなり、ハイブリダイゼーション反応が効率よく進行することになる。この結果、ハイブリダイゼーションの反応時間が短縮化されるとともに、疑陽性又は疑陰性を示す確率も減少する。

ここで、セル検出部2の反応領域10側に突設されたカンチレバー13を拡大して図3に示す。この図3は、カンチレバー13の端面13aにその末端部位が固定化された検出用ヌクレオチド鎖Dと該検出用ヌクレオチド鎖Dの塩基配列と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖Tとがハイブリダイゼーションし、2本鎖を形成している状態を模式的に表したものである。なお、図3では、簡単のため、端面13aに1本の検出用ヌクレオチド鎖Dが固定化されている状態を示しているが、実際にはカンチレバー13の幅に応じて相当数の検出用ヌクレオチド鎖Dが固定化される。

反応領域10に対しては、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こり得るアガロースゲル等の相変化物質（図示せず）を充填することも可能である。この場合には、相変化物質を高温下でゾル化し、この状態で電圧を印加して1本鎖DNA等のヌクレオチド鎖を配列した後に、温度を低下させてゲル化し、さらに続いてハイブリダイゼーション時には、反応至適温度でゾル化する手順を行うことができるという利点がある。また、ハイブリダイゼーション時において相変化物質をゲル状態に保持しておけば、DNA等のヌクレオチド鎖を伸長させた状態でハイブリダイゼーションさせることができるため好適である。

なお、上記相変化物質がゲル化した状態のときには、標的ヌクレオチド鎖Tを含む試料溶液S'をセル検出部2に滴下した際に、ハイブリダイゼーションの進行が妨げられる虞があるため、通常の電気泳動の場合と同様に、滴下ポイントに垂直方向の溝を予め形成しておき、この溝の中に試料溶液S'を滴下するようにしてもよい。

ところで、上述したカンチレバー13は、対向電極間に圧電材料を配置してなる振動子を有しており、交流電圧を印加することで、その周波数に応じて振動させることができる。この際、カンチレバー13の全体を圧電振動子として形成す

ることもでき、また、カンチレバー 13 上に圧電素子を形成することもできる。

このカンチレバー 13 は、例えば日本公開特許公報 2001-347499 号に記載された技術を応用して作製することができる。この作製手法の原理を図 4 A 乃至図 4 D を用いて簡潔に説明する。

先ず、図 4 A に示すように、セル検出部 2 となるシリコン基板 20 の底部の一部に、最終的に空隙部分を形成するための犠牲層となるポリシリコン層 21 を形成し、底部全体が一様な高さとなるようにする。そして、底部表面にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法などにより、カンチレバー 13 を作製する部分以外をマスクするレジストパターンを形成する。その後、例えば $\text{SiH}_4\text{-N}_2\text{O}$ 系を用いた CVD (Chemical Vapor Deposition: 化学的気相成長) 法により、図 4 B に示すように SiO_2 (二酸化シリコン) からなる絶縁層 22 を形成する。なお、 SiO_2 に限らず、例えば $\text{SiH}_4\text{-NH}_3$ 系を用いた CVD 法により、 SiN_x (窒化シリコン) からなる絶縁層 22 を形成するようにしても構わない。

そして、図 4 C に示すように、Pt (白金) 又は In (インジウム) 等からなる下部電極層 23、PZT (Pb(Ti, Zr)O_3 : ジルコン酸チタン酸鉛) 又は SBT ($\text{SrBi}_2\text{Ta}_2\text{O}_9$: タンタル酸ストロンチウムビスマス) 等からなる圧電材料層 24、Pt 又は In 等からなる上部電極層 25 を順次積層してパターンニングする。

最後に、図 4 D に示すように、真空チャンバ内で XeF_2 (二フッ化キセノン) 又は BrF_3 (三フッ化臭素) を昇華させて導入し、選択的エッチングによりポリシリコン層 21 を完全に除去する。

本実施の形態では、このようにして作製されたカンチレバー 13 の固有振動数変化を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応の有無を検出する。

具体的には、図 5 に示すように、下部電極層 23 と上部電極層 25 とを接続した交流回路を形成し、カンチレバー 13 の駆動源となる交流電源 30 により周波数を変化させながらカンチレバー 13 を振動励起する。そして、共振振幅に関連した電流を抵抗 31 で電圧変換し、この電圧を振動検出手段としての電圧計 32 で計測する。電圧計 32 で計測される電圧波形は、例えば図 6 の実線のようになる。なお、カンチレバー 13 の共振振幅は、交流電源 30 の周波数がカンチレバ

ー 1 3 の固有振動数と一致したときに最大となるため、電圧のピーク時における交流電源 3 0 の周波数 f_1 は、カンチレバー 1 3 の固有振動数を示している。

ここで、カンチレバー 1 3 の端面 1 3 a に固定化された検出用ヌクレオチド鎖 D と該検出用ヌクレオチド鎖 D の塩基配列と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖 T とがハイブリダイゼーションして 2 本鎖を形成した場合、標的ヌクレオチド鎖 T に由来するカンチレバー 1 3 の質量増加によりカンチレバー 1 3 の固有振動数が低下する。これにより、電圧波形は図 6 の破線の位置に下方シフトし、ピーク時における交流電源 3 0 の周波数は f_2 となる。

したがって、この電圧のピーク時における周波数（固有振動数）の変化を検出することにより、ハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。

さらに、この固有振動数の変化量 ($f_1 - f_2$) は、カンチレバー 1 3 の質量変化量と正に相関するため、検出用ヌクレオチド鎖 D の固定化前の固有振動数、検出用ヌクレオチド鎖 D の固定化後の固有振動数、及びハイブリダイゼーション反応完了後の固有振動数を測定することで、カンチレバー 1 3 に固定化された検出用ヌクレオチド鎖 D の本数、或いは検出用ヌクレオチド鎖 D とハイブリダイゼーションした標的ヌクレオチド鎖 T の本数を定量的に検出することが可能である。

なお、質量変化の大きい方が固有振動数変化の検出感度が上がるため、標的ヌクレオチド鎖 T の末端をアンカー分子で修飾し、質量を増加させておくことが好ましい。

また、上述したように反応領域 1 0 にアガロースゲル等の相変化物質を充填している場合には、正確に振動数を検出できない虞があるため、ハイブリダイゼーション反応完了後、振動数の測定前に、この相変化物質をゾル化し、基板 1 を回転させることで生じる遠心力の作用により、相変化物質を除去してもよい。

以上の例では、カンチレバー 1 3 の全体を圧電振動子としたが、これに限定されるものではなく、図 7 に示すように、カンチレバー 1 3 の上部に駆動電極となる圧電素子 4 0 a と検出電極となる圧電素子 4 0 b とを設けるようにしても構わない。この場合における圧電素子 4 0 a 及び 4 0 b を含む位置でのカンチレバー 1 3 の垂直断面図を図 8 に示す。

図 8 に示すように、カンチレバー 1 3 は、シリコン基板 4 1 上に SiO_2 又は S

i N_xからなる絶縁層 4 2 が形成されたものである。また、圧電素子 4 0 a 及び 4 0 b は、P t 又は I n からなる下部電極層 4 3 a, 4 3 b、P Z T 又は S B T からなる圧電材料層 4 4 a, 4 4 b、P t 又は I n からなる上部電極層 4 5 a, 4 5 b とが順次積層されたものである。

ハイブリダイゼーション反応の有無を検出する際には、駆動源となる交流電源 5 0 により周波数を変化させながらカンチレバー 1 3 を振動励起する。そして、共振振幅に基づく電位差を振動検出手段としての電圧計 5 1 で計測する。上述と同様に、ハイブリダイゼーション反応によりカンチレバー 1 3 の質量が増加すると、カンチレバー 1 3 の固有振動数が低下し、電圧のピーク時における交流電源 5 0 の周波数は低くなる。

以上のようにしてハイブリダイゼーション反応に由来する固有振動数変化が確認された場合、例えば所定の細胞等から抽出された試料溶液 S' 中に、特定の疾患に関連するマーカー遺伝子を含む検出用ヌクレオチド鎖 D と相補性を有する標的ヌクレオチド鎖 T が存在するという事実が認識でき、その結果、上記細胞には上記疾患が発生していることが予測されることになる。

次に、本実施の形態におけるバイオアッセイ装置に用いられる基板の他の例について、図 9 A 及び図 9 B を参照しながら説明する。ここで、図 9 A は、本例における基板の上方視平面図を示し、図 9 B は、図 9 A 中の X 部の拡大平面図を示す。

図 9 A に示す基板 6 0 は、条溝検出部 6 1 を備える。この条溝検出部 6 1 は、反応領域 7 0 が基板 6 0 上に放射状に延設された条溝を備え、該条溝を形成する長手方向の片側からは、図 9 B に示すように、上記セル検出部 2 におけるカンチレバー 1 3 と同様の構成を備えるカンチレバー 7 3 が所定間隔で突設されている。また、カンチレバー 7 3 が設けられた各部位には、反応領域 7 0 を挟むように正負電極 7 1, 7 2 が対設されている。なお、条溝検出部 6 1 は、上記セル検出部 2 が条溝内に配列された構成ともいえる。

各正電極 7 1 は共通電極化することができ、同様に各負電極 7 2 についても共通電極化できる。すなわち、正の共通電極と負の共通電極とを、反応領域 7 0 を挟むように対向させて、基板 6 0 上に放射状をなすように並設することができる。

この構成により、針状のプロープを正負の共通電極に上方から押し当てて、通電させることができる。

上述の反応領域 70 は、各条溝内に配列形成したピット（図示せず）に形成してもよく、このピットの反応領域に微小滴を滴下することによって、ほぼ同一のスポットサイズを実現することができる。

また、この条溝検出部 61 では、毛細管現象を利用した送液や、円盤状の基板 60 を所定の方法で回転させることによって生じる遠心力を活かした送液手段も利用することができる。

具体的には、基板 60 の中心部に液溜部 62 を設け、この液溜部 62 に試料溶液 S（S'）や、反応後にアクティブに結合しなかった余分な標的ヌクレオチド鎖 T を除去するための洗浄液等を注入し、基板 60 を回転させることによって、基板中心領域から条溝内（すなわち反応領域 70）に円滑かつ確実に送液することができる。

なお、この条溝検出部 61 においても、条溝検出部単位又はグルーピングされた条溝検出部単位に、異なる検出用ヌクレオチド鎖 D を固定化することができる。

以下、基板 1, 60 の位置情報及び回転同期情報について簡潔に説明する。基板 1, 60 の回転方向には、予めディスクマスタリングプロセスにより形成された多数のアドレスピットが形成されている。基板 1, 60 を光ディスクとして考えた場合、滴下検出位置である反応領域 10, 70 は、ユーザーデータ領域と考えられる。他の領域には、サンプルサーボ方式等により同期ピットを配列し、かつトラッキングサーボとしても利用し、さらに、直後にアドレス部（ディスク上の地理的な番地）を挿入することによって位置情報を与える。

アドレス部は、先頭パターンであるセクターマークから始まり、実際に回転しているディスクの回転位相を与える VFO、アドレスデータの開始位置を与えるアドレスマーク、トラック及びセクタのナンバーが入った ID（Identifier）などが組み合わされてなる。

上述した構成の基板 1, 60 を用いてバイオアッセイを行うには、少なくとも以下の手段及び機構を備える装置を使用する。すなわち、上記基板 1, 60 を回転可能に保持する基板回転手段と、この基板回転手段によって基板 1, 60 を回

転させながら、反応領域 10, 70 に対して試料溶液 S (S') を一定の順序、タイミングで滴下する滴下手段と、該滴下手段 (のノズル) と基板との間の距離を一定に保持するためのフォーカスサーボ機構と、基板 1, 60 から提供される位置情報及び回転同期情報に基づいて、試料溶液 S (S') の滴下を基板 1, 60 の反応領域 10, 70 に追従させるトラッキングサーボ機構とを少なくとも備えている装置 (図示せず) である。

以上説明した基板 1, 60 及びこれらを用いるバイオアッセイ装置を採用すれば、上述した本発明に係る相互反応作用検出方法を好適に実施することができる。

すなわち、カンチレバー 13, 73 の端面に固定化された検出用ヌクレオチド鎖 D と標的ヌクレオチド鎖 T とがハイブリダイゼーションするとカンチレバー 13, 73 の質量が増加するため、カンチレバー 13, 73 の固有振動数が低下する。そこで、この固有振動数変化を測定することで、ハイブリダイゼーションを検出することができる。

また、正電極 11, 71 及び負電極 12, 72 によって反応領域 10, 70 に電場を形成することにより、反応領域 10, 70 内の検出用ヌクレオチド D と標的ヌクレオチド T とを伸長させた状態で相対的に移動させ、ハイブリダイゼーションを行わせることができるため、ハイブリダイゼーションの効率が向上する。

なお、本発明は、図面を参照して説明した上述の実施例に限定されるものではなく、添付の請求の範囲及びその主旨を逸脱することなく、様々な変更、置換又はその同等のものを行うことができることは当業者にとって明らかである。

例えば、上述の実施の形態では、バイオアッセイ用基板を円盤状に形成したが、この形態に限定されるものではなく、矩形状その他の平板状の形態を適宜選択決定することができる。

また、上述の実施の形態では、検出用ヌクレオチド鎖 D と標的ヌクレオチド鎖 T とのハイブリダイゼーション反応の有無を検出する場合を代表例として説明したが、本発明は、このようにハイブリダイゼーション反応の有無を検出する例に限定されるものではない。

すなわち、上述した反応領域 10, 70 においては、ハイブリダイゼーション反応に加え、検出用ヌクレオチド鎖 D から所望の 2 本鎖ヌクレオチドを形成し、

該2本鎖ヌクレオチドとペプチド（又はタンパク質）との相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互作用を行わせることができる。具体的に、上記2本鎖ヌクレオチドを用いる場合には、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA分子との結合などを分析することができる。

このように、本発明において「バイオアッセイ」とは、ハイブリダイゼーションその他の物質間の相互反応に基づく生化学的分析を広く意味するものである。

産業上の利用可能性

上述した本発明は、DNAチップに基づくバイオアッセイ方法に特に好適であり、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等にご利用でき、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用できる。

請求の範囲

1. 検出用物質を固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーと、当該表面処理部に固定化された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、上記カンチレバーを振動励起する駆動源と、上記カンチレバーの振動振幅を検出する振動検出手段とを少なくとも備える検出部において物質間の相互反応作用を検出する相互反応作用検出方法であって、

上記相互反応作用に基づく上記カンチレバーの固有振動数の変化を測定することで、上記相互反応作用を検出する検出工程を有すること
を特徴とする相互反応作用検出方法。

2. 請求の範囲第1項記載の相互反応作用検出方法であって、

上記カンチレバーは、対向電極間に圧電材料を配置してなる振動子を有しており、

上記駆動源は、上記対向電極間に交流電圧を印加することにより上記カンチレバーを振動励起すること

を特徴とする相互反応作用検出方法。

3. 請求の範囲第1項記載の相互反応作用検出方法であって、

上記検出用物質及び上記標的物質がヌクレオチド鎖であり、上記相互反応作用がハイブリダイゼーションであることを特徴とする相互反応作用検出方法。

4. 請求の範囲第3項記載の相互反応作用検出方法であって、

上記反応領域に電場を形成し、該反応領域内の検出用ヌクレオチドと標的ヌクレオチドとを伸長させた状態で相対的に移動させ、ハイブリダイゼーションを行わせる電場形成工程を有することを特徴とする相互反応作用検出方法。

5. 検出用物質を固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーと、当該表面処理部に固定化された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域と、上記カンチレバーを振動励起する駆動源と、上記カンチレバーの振動振幅を検出する振動検出手段とを少なくとも有する検出部を備えたことを特徴とするバイオアッセイ装置。

6. 請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ装置であって、

上記カンチレバーは、対向電極間に圧電材料を配置してなる振動子を有しており、

上記駆動源は、上記対向電極間に交流電圧を印加することにより上記カンチレバーを振動励起すること

を特徴とするバイオアッセイ装置。

7. 請求の範囲第5項記載のバイオアッセイ装置であって、

上記検出用物質及び上記標的物質がヌクレオチド鎖であり、上記相互反応作用がハイブリダイゼーションであることを特徴とするバイオアッセイ装置。

8. 請求の範囲第7項記載のバイオアッセイ装置であって、

上記検出部は、上記反応領域に電場を形成し、該反応領域内の検出用ヌクレオチドと標的ヌクレオチドとを伸長させた状態で相対的に移動させ、ハイブリダイゼーションを行わせる電場形成手段をさらに有することを特徴とするバイオアッセイ装置。

9. 検出用物質を固定可能なように少なくともその一部に表面処理が施されたカンチレバーと、当該表面処理部に固定化された状態の検出用物質と標的物質との相互反応作用の場を提供する反応領域とを少なくとも備える検出部が設けられたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

10. 請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記検出部は、上記カンチレバーが一壁面から突出して設けられたセル検出部であって、当該セル検出部が基板上に複数配設されたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

11. 請求の範囲第10項記載のバイオアッセイ用基板であって、

円盤状基板として形成され、

上記セル検出部は、上記円盤状基板上に上方視放射状を呈するように配設されたこと

を特徴とするバイオアッセイ用基板。

12. 請求の範囲第10項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記セル検出部単位又はグルーピングされた複数のセル検出部単位に、異なる

検出用物質が固定化されたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

13. 請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板であって、

円盤状基板として形成され、

上記反応領域は、基板上に放射状に延設された条溝内に設けられ、上記条溝の片側から上記カンチレバーが突出して設けられたこと

を特徴とするバイオアッセイ用基板。

14. 請求の範囲第13項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記条溝単位又はグルーピングされた複数の条溝単位に、異なる検出用物質が固定化されたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

15. 請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記反応領域に対して、室温と反応至適温度との間で、ゲル、ゾルの可逆相変化が起こり得る物質を充填したことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

16. 請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記相互反応作用に基づく上記カンチレバーの固有振動数の変化を測定することで上記相互反応作用が検出されることを特徴とするバイオアッセイ用基板。

17. 請求の範囲第9項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記検出用物質及び上記標的物質がヌクレオチド鎖であり、上記相互反応作用がハイブリダイゼーションであることを特徴とするバイオアッセイ用基板。

18. 請求の範囲第17項記載のバイオアッセイ用基板であって、

上記検出部は、上記反応領域に電場を形成し、該反応領域内の検出用ヌクレオチドと標的ヌクレオチドとを伸長させた状態で相対的に移動させ、ハイブリダイゼーションを行わせる電場形成手段をさらに有することを特徴とする請求項17記載のバイオアッセイ用基板。

1/7

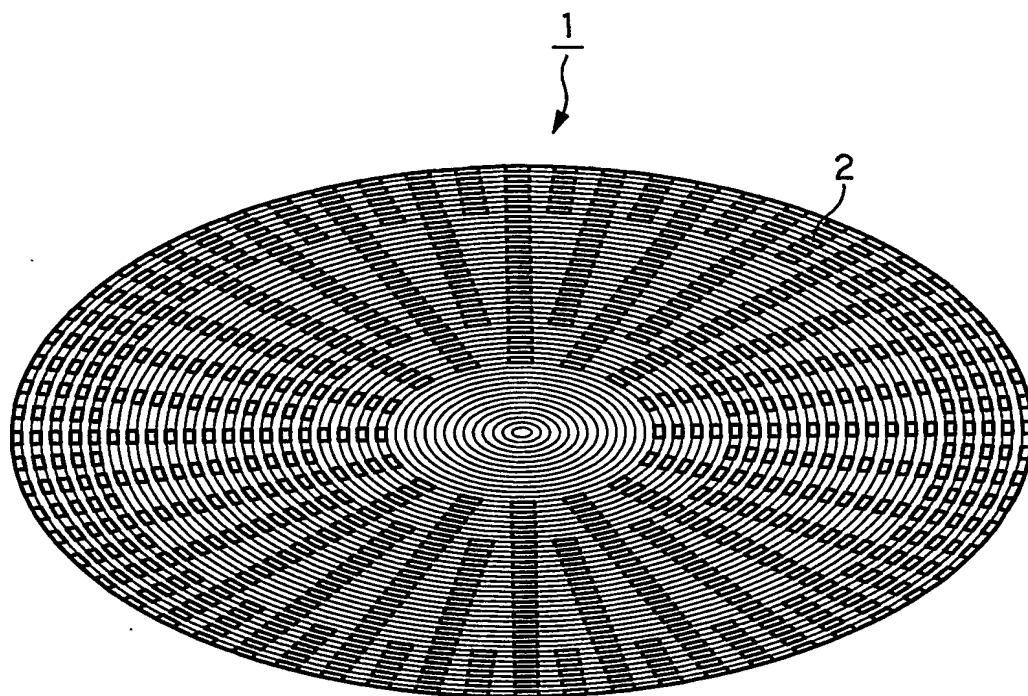


FIG. 1

2/7

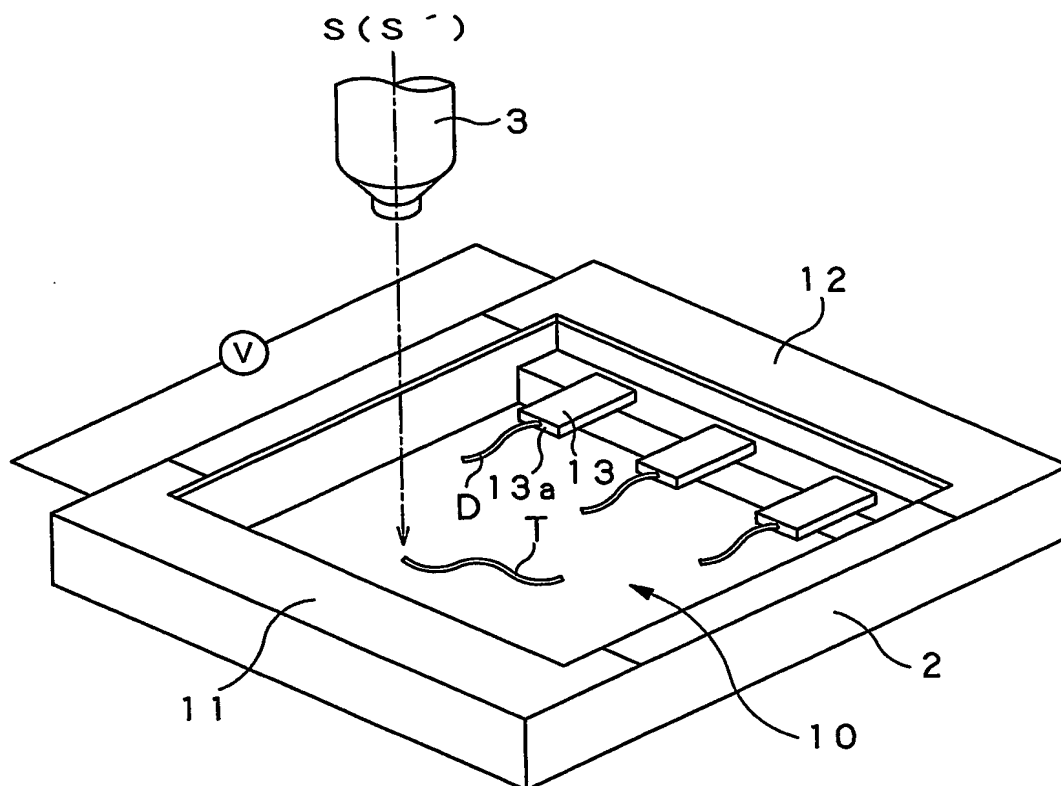


FIG. 2

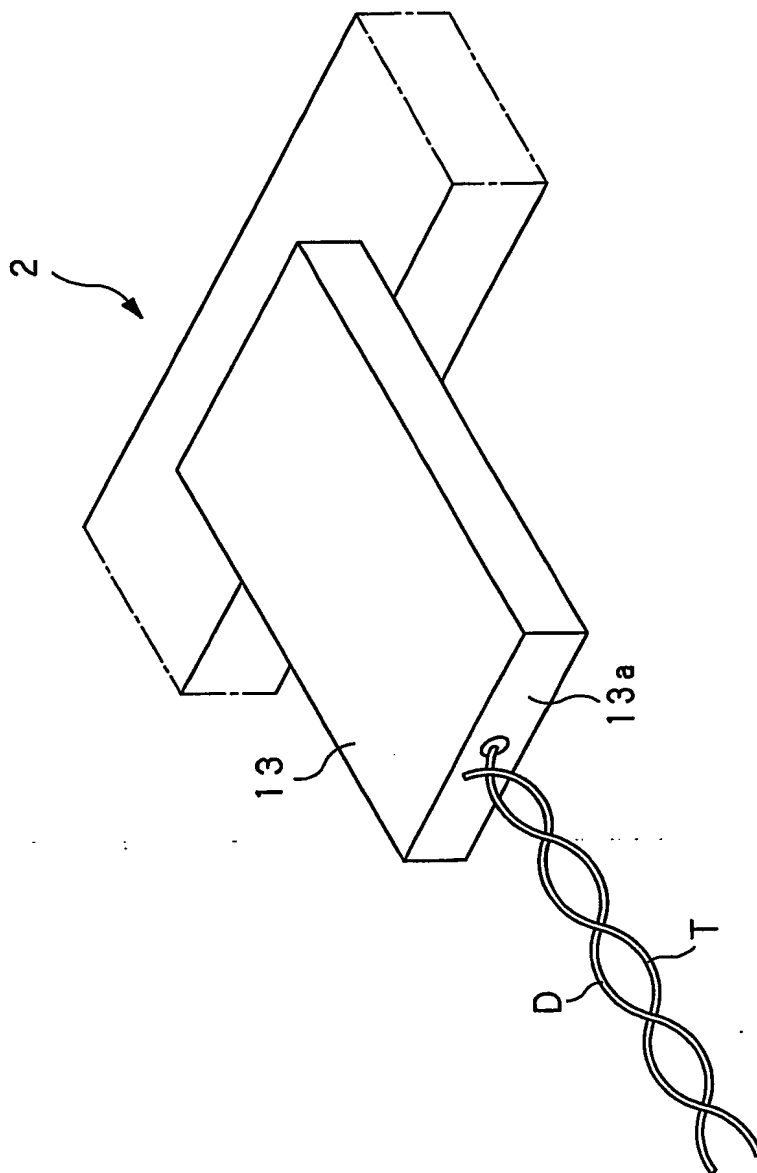


FIG. 3

4/7

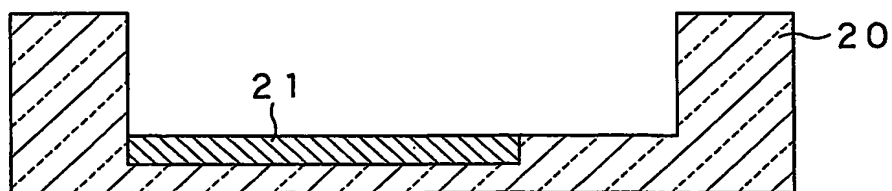


FIG. 4A

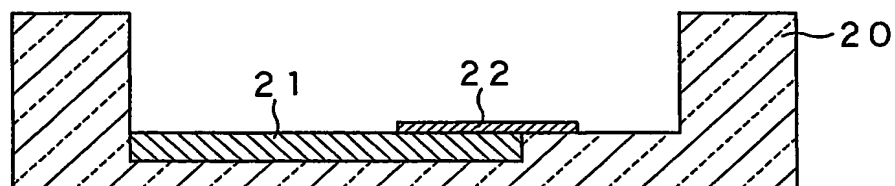


FIG. 4B

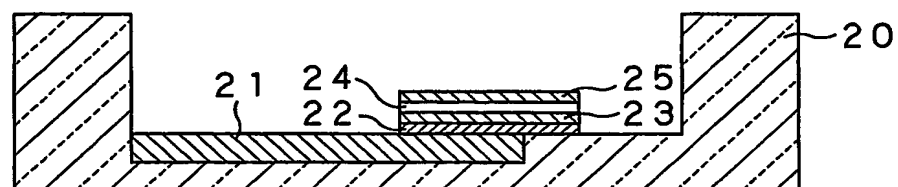


FIG. 4C

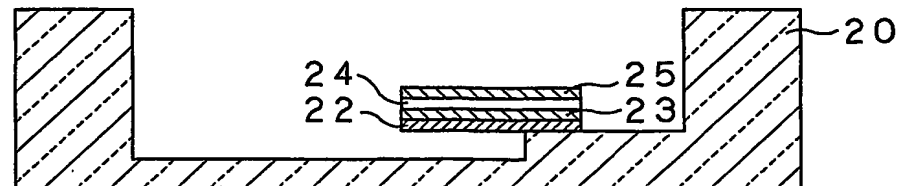


FIG. 4D

5/7

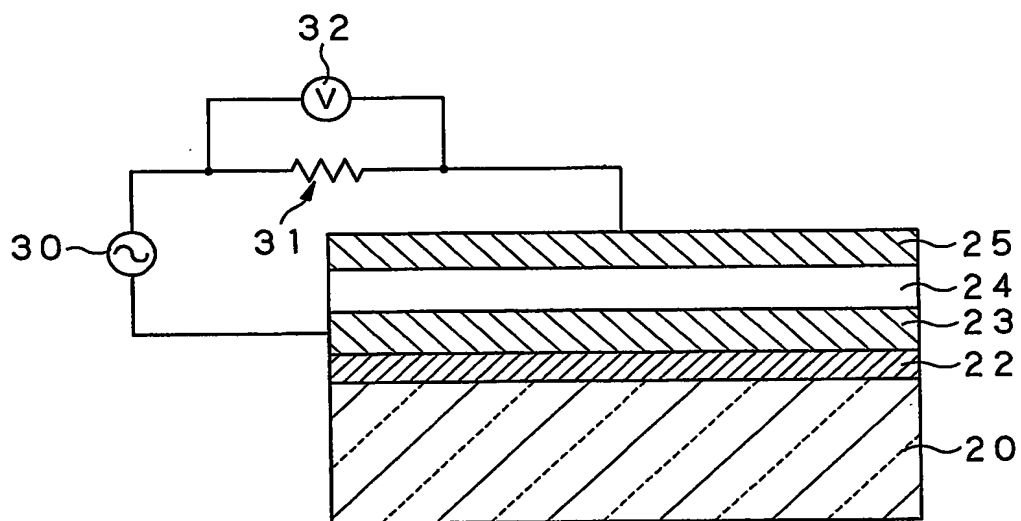


FIG.5

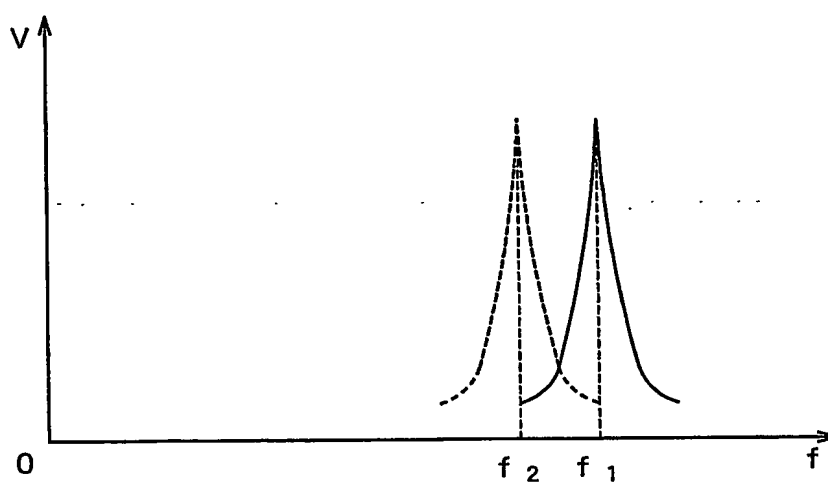


FIG.6

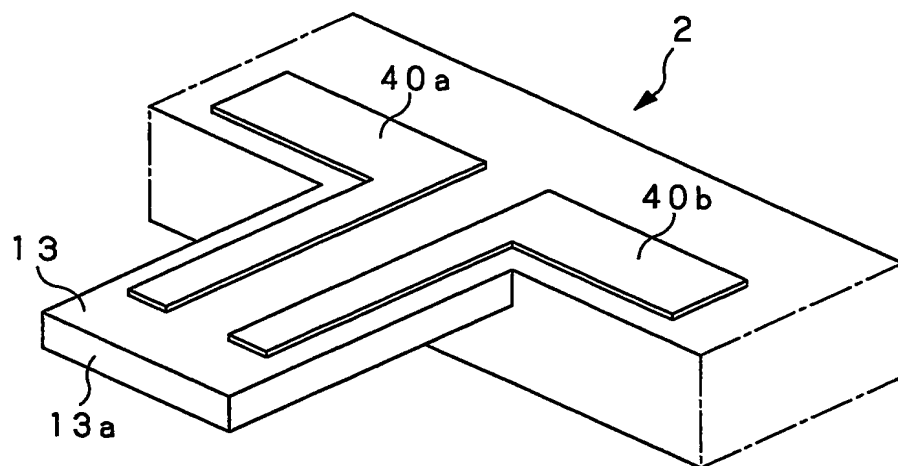


FIG. 7

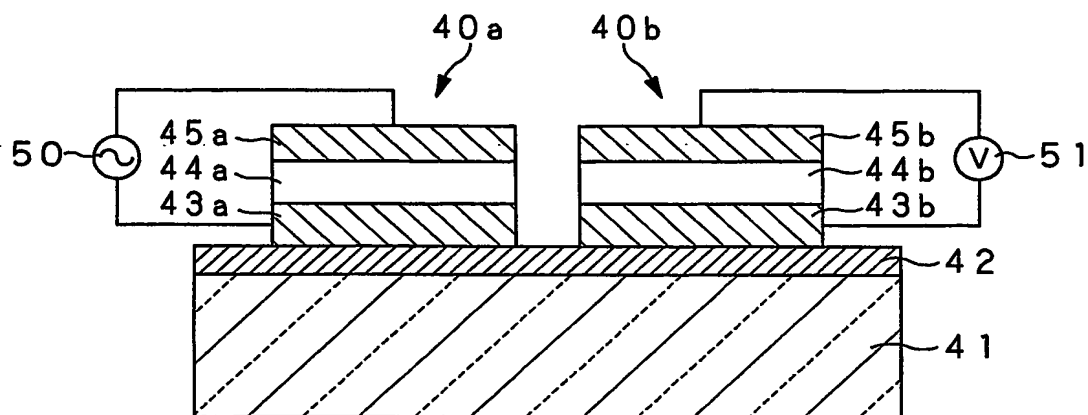


FIG. 8

7/7

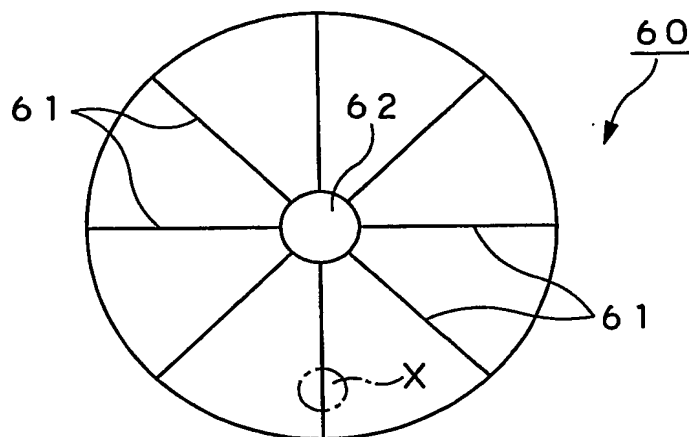


FIG. 9A

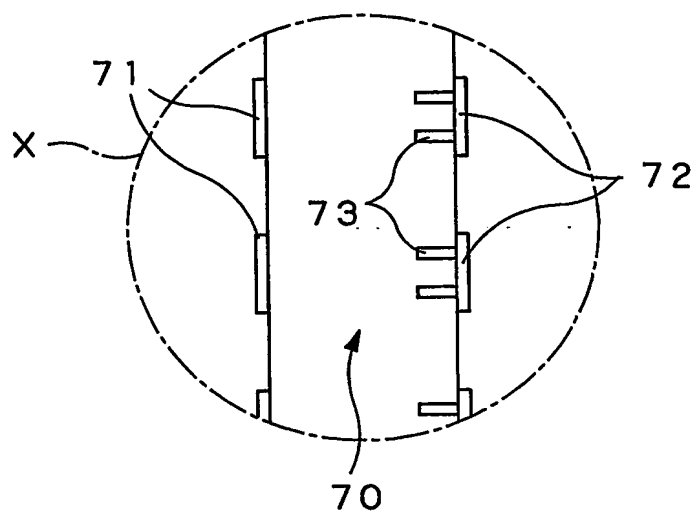


FIG. 9B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N13/16, G01N33/566, C12N15/00,
C12Q1/68, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/48-33/98, G01N37/00, G01N13/10-13/24,
G12B21/00-21/24, C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70,
C12M1/00-1/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/50773 A (UNIVERSITY OF MINNESOTA), 12 November, 1998 (12.11.98),	1, 2, 5, 6, 9, 10, 12, 16
Y	Full text; Figs. 1 to 12b (Family: none)	3, 4, 7, 8, 11, 15, 17, 18
Y	US 6183970 B (Hitachi, Ltd.), 06 February, 2001 (06.02.01), Full text; Figs. 1 to 15 & JP 2000-60554 A Full text; Figs. 1 to 15	3, 4, 7, 8, 17, 18
Y A	JP 2002-250726 A (Toray Industries, Inc.), 06 September, 2002 (06.09.02), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	11 13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 December, 2003 (30.12.03)

Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/53812 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 14 September, 2000 (14.09.00), Full text; Figs. 1 to 10 & JP 2003-526331 A Full text; Figs. 1 to 10	15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N13/16, G01N33/566,
C12N15/00, C12Q 1/68, C12M 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/48-33/98, G01N37/00, G01N13/10-13/24,
G12B21/00-21/24,
C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70, C12M1/00-1/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2004年
日本国登録実用新案公報 1994-2004年
日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 98/50773 A (UNIVERSITY OF MINNESOTA), 1998. 11. 12, 全文, 第1-12b図, (ファミリーなし)	1, 2, 5, 6, 9, 10, 12, 16, 3, 4, 7, 8, 11, 15, 17, 18
Y		

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 12. 03

国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

遠藤 孝徳

2 J

2909

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 6183970 B (Hitachi, Ltd.) , 2001. 02. 06, 全文, 第1-15図 & JP 2000-60554 A, 全文, 第1-15図	3, 4, 7, 8, 17, 18
Y A	JP 2002-250726 A (東レ株式会社) , 2002. 09. 06, 全文, 第1-5図, (ファミリーなし)	11 13, 14
Y	WO 00/53812 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) , 2000. 09. 14, 全文, 第1-10図 & JP 2003-526331 A, 全文, 第1-10図	15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.